

RT-PCR 扩增 MUC1 检测胃癌微转移研究*

陈瑞川¹ 林 岚¹ 邱达泰² 苏金华¹ 吴艳环³

目的 以 RT-PCR 检测胃周淋巴结胃癌转移细胞并评价其临床应用价值。**方法** 以 MUC1 cDNA 的特异序列为 RT-PCR 引物, 酶切分析及系列稀释法对该法的特异性和敏感性进行分析, 对临床收集的胃周淋巴结样品作 RT-PCR 检测及产物 DNA 点杂交验证。**结果** (1) 胃及胃癌组织均存在 MUC1 mRNA 的表达; (2) 该扩增体系具有较好的特异性; (3) 敏感性可达 1 pg RNA, 相当于从 10⁵ 个淋巴细胞中检出 1 个胃癌细胞; (4) 对临床样品检测的结果显示较病理检查敏感, PCR 产物点杂交进一步证实 MUC1 作为 PCR 标志物有较好的可靠性。**结论** 该法具有较高的可靠性和较好的应用前景。

关键词 胃癌, 转移; 反转录多聚酶链反应检测; 多形上皮细胞粘蛋白

目前癌转移的临床检测多靠病理检查, 敏感性较差。反转录多聚酶链反应(RT-PCR)检测癌淋巴结微转移的原理是选择肿瘤起源组织有表达而被转移组织不表达的基因转录产物作为 RT-PCR 扩增标志物, 通过 RT-PCR 扩增检测淋巴结总 RNA 中是否有该靶基因的转录产物, 以判断是否存在转移的癌细胞^[1]。因此, 选择合适的 RT-PCR 扩增标志物是关键之处。MUC1 是多形上皮细胞粘蛋白(polymorphic epithelial mucin)的核心蛋白基因^[2], 已有人将其应用于 RT-PCR 检测乳腺癌细胞淋巴结微转移^[1], 但尚未见用于检测胃癌细胞淋巴结微转移的报道, 而且该基因在胃及胃癌组织中的表达状况也不清楚。本文参考文献[1]以 MUC1 cDNA 的特异序列为 RT-PCR 引物, 初步探讨 MUC1 mRNA 作为标志物用于 RT-PCR 检测临床胃周淋巴结样品微转移胃癌细胞的前景。

1 材料与方法

1.1 试剂及样品

1.1.1 试剂 反转录酶、Taq 酶、内切酶等均为 Promega 产品, DIG DNA 标记及检测试剂盒为宝灵曼公司产品, 有关的生化试剂等购自华美生物工程公司上海分公司, 其余均为国产分析纯。

1.1.2 细胞及组织样品 人胃腺癌 MGC-803 及人早幼白血病 HL-60 细胞株为本单位细胞生物学研究室保存; 常规方法培养。胃周淋巴结样品分别取自胃癌患者手术切除标本(40 例)和非癌患者胃手术切除标本(11 例), 胃及胃癌活检样品取自行胃镜检查患者(共 25 例)。样品均做病理常规检查, 其中淋巴结样品镜检证实转移阳性者 32 例, 阴性者 19 例。外周血取自健康人, 常规方法分离白细胞。

1.1.3 引物合成 MUC1 及 β -actin 的引物序列^[1]:

MF: 5'-GGT ACCTCCT CT CACCTCCTCCA-3'

MR: 5'-CGT CGTGGACATTGATGGT ACC-3'

AF: 5'-TCATCACCATTGGCAATGAG-3'

AR: 5'-CACTGTGTTGGCGTACAGGT-3'

以 cDNA 为模板, MF+MR 的扩增产物长 288 bp; AF+AR 的扩增产物长为 154 bp; 以基因组 DNA 为模板的扩增产物, 前者长 536 bp, 后者为 254 bp。引物均由上海生

* : 福建省卫生厅科研基金资助课题(96075)

1. 厦门大学抗癌中心(厦门 361005)

2. 厦门市思明区人民医院内科(厦门 361005)

3. 厦门市中山医院消化科(厦门 361005)

工公司合成。

1.2 总RNA提取 按 Chomczynski 的一步法^[3]。

1.3 反转录 参照文献[4]以 AMV 反转录酶及随机引物进行反转录。

1.4 PCR 扩增 参照报道方法[2],产物以 2% 琼脂糖电泳分析。

1.5 PCR 产物的酶切鉴定 根据 β -actin 及 MUC1 PCR 扩增产物的序列,以 DNASIS 软件分析内切酶位点,选择 Hinf 和 Hae 按常规方法对上述两种扩增产物进行酶切,聚丙烯酰胺凝胶电泳后 EB 染色观察。

1.6 PCR 产物的点杂交验证 取 RT-PCR 扩增产物经碱变性后于 12×8 孔的点膜器上点于硝酸纤维膜,80℃ 烤 2 h。另取上述经酶切鉴定及低熔点琼脂糖电泳纯化的 PCR 产物为模板,按 DIG DNA 标记检测试剂盒说明进行探针标记及杂交检测^[5]。

2 结果

2.1 胃及胃癌组织的 RT-PCR 扩增检测

胃活检标本及胃癌组织以 RT-PCR 检测 MUC1 mRNA,显示均有 MUC1 基因表达,而 HL-60 及正常淋巴结仅有 β -actin 表达。表明 MUC1 mRNA 可用作胃癌淋巴结微转移检测的标志物。

2.2 RT-PCR 的扩增特异性 由 DNASIS 软件系统分析结果,MUC1 的 RT-PCR 产物经 Hinf I 酶切后可产生 248 bp 及 40 bp 的片段,经 Hae 酶切后产生 202, 33, 31 及 22 bp 的片段; β -actin 的 PCR 扩增产物经 Hinf 酶切后产生 86 bp 及 68 bp 的片段(图 1)。

上述 MUC1 及 β -actin 的部分 PCR 产物分别经 Hinf 或 Hae 酶切后电泳分析显示,酶切后产生的片段均正确,表明 MUC1 mRNA 用作 RT-PCR 的标志物有较好的扩增特异性。

2.3 RT-PCR 的检测敏感性 来自 MGC-803 总 RNA 的反转录产物按 10 倍稀释后各

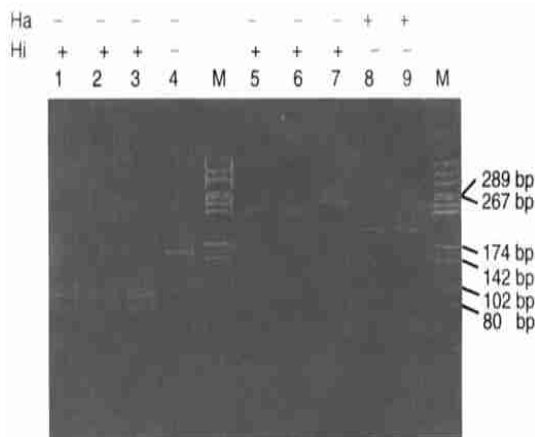


图 1 部分样品 RT-PCR 扩增产物的酶切分析结果
Ma: pGEM-3Zf(+)/Hae marker; 1: HL-60; 2: 淋巴结; 3: 外周血白细胞; 4: β -actin; 5, 8: MGC-803; 6, 9: 胃活检标本; 7: MUC1

取 1 μ l (相当于 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg RNA), 再各加外周血白细胞 RNA 反转录产物 1 μ l (相当于 RNA 0.1 μ g) 混合作为模板,分别以 MUC1 及 β -actin 的引物进行 PCR 扩增,扩增后将 MUC1 及 β -actin 的扩增管中 PCR 产物混匀,电泳分析结果见图 2。检测敏感性达 1 pg RNA,该敏感性相当于从 10⁵ 个淋巴细胞中检测出 1 个胃癌细胞。

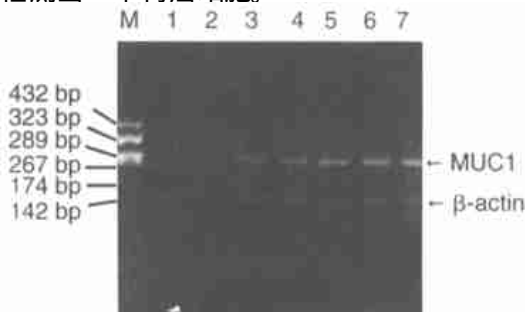


图 2 RT-PCR 的检测敏感性分析

Ma: pGEM-3Zf(+)/Hae marker; A: β -actin; M: MUC1; 1~7: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg MGC-803 RNA

2.4 临床样品的 RT-PCR 分析 以 MUC1 引物及 β -actin 引物分别对所收集的胃周淋巴结样品进行 RT-PCR 检测。40 例来自胃癌

患者的标本中 RT-PCR 检测和病理切片检查均转移阳性者为 32 例, 另 8 例病理检查阴性者中有 5 例被 RT-PCR 检测阳性(图 3); 来自非胃癌患者(无癌细胞)的 11 例胃周淋巴结标本, RT-PCR 检测和病理检查结果均阴性, 表明 RT-PCR 检测敏感性较病理检查法高(附表)。

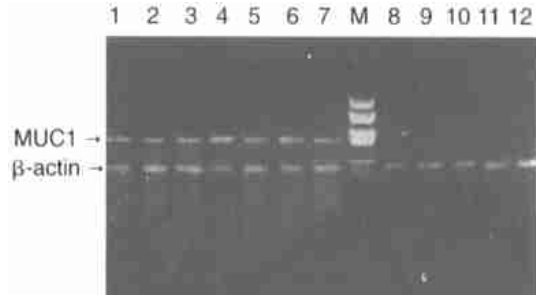


图 3 病理检查阴性胃周淋巴结样品的 RT-PCR 检测结果

Ma: pGEM-3Zi(+)/Hae marker; 1, 2: 病理检查阳性胃癌淋巴结样品; 3~10: 病理检查阴性胃癌淋巴结样品(其中 8~10 MUC1 阴性); 11, 12: 非胃癌胃周淋巴结样品。

附表 胃周淋巴结样品 RT-PCR 检测与病理检查结果比较

RT-PCR 检测	病理检查		
	阳性	阴性	合计
阳性	32	5	37
阴性	0	14	14
合计	32	19	51

2.5 PCR 产物的点杂交验证 以上述 RT-PCR 产物点膜, 分别以 β -actin 及 MUC1 的 DIG 标记探针进行杂交检测, 以 β -actin 探针杂交检测所有产物均阳性; MUC1 探针检测显示上述 RT-PCR 检测阳性者(37 例)均有杂交信号, 阴性者(14 例)则无, 表明 MUC1 作为 RT-PCR 检测胃癌淋巴结微转移标志基因有较好的可靠性。部分胃周淋巴结样品 RT-PCR 产物的点杂交检测结果见图 4。

3 讨论

MUC1 是多型上皮细胞粘蛋白的核心蛋白基因, 已被证实只在淋巴细胞中不表达^[1],

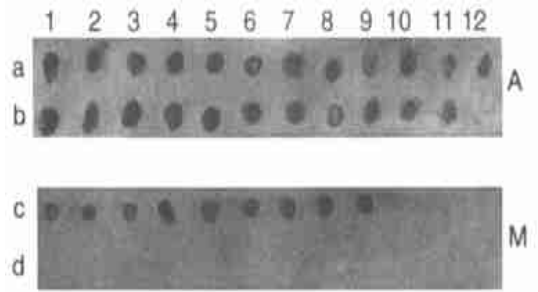


图 4 病理检查阴性胃周淋巴结样品 RT-PCR 产物的 DNA 点杂交结果

M: MUC1 探针杂交; A: β -actin 探针杂交; a1~4, c1~4: 病理检查阳性胃癌淋巴结样品; a5~12, c5~12: 病理检查阴性胃癌淋巴结样品; b1~11, d1~11: 非胃癌淋巴结样品; b12, d12: 生理盐水对照。

而在乳腺癌^[1]、胆管癌^[2]等上皮源肿瘤细胞中有表达。Noguchi 的报道证实 MUC1 可用于检测乳腺癌淋巴结微转移^[3], 敏感性达 1 个乳腺癌细胞/10⁶ 个淋巴细胞, 但未见有其他应用报道。胃癌为上皮源细胞, 笔者推测胃癌细胞也应有 MUC1 基因表达。本文以 RT-PCR 方法对胃活检标本及胃癌组织进行了检测, 发现 MUC1 基因在胃及胃癌组织的表达率为 100%, 表明 MUC1 mRNA 可作为检测胃癌淋巴结转移的标志物。对检测敏感性的分析显示本法可从 10⁵ 个淋巴细胞中检测出 1 个胃癌细胞, 比 Mori 报道^[6]的以 CEA mRNA 为标志物检测胃癌淋巴结转移的敏感性高 10 倍, 也较病理探查结果更敏感; 但比 Noguchi 报道^[2]的敏感性低。这一方面可能与各作者的标定方法不同有关, 另一方面是否与 MUC1 在胃癌及乳腺癌细胞表达量不同有关尚待探讨。

RT-PCR 检测的敏感性已被公认, 但也常出现非特异扩增^[7]; 由于目前尚无较 RT-PCR 更敏感的方法来对 RT-PCR 的临床检测结果的特异性进行验证, 本文尝试以酶切分析法及 DNA 点杂交法对扩增产物进行分析, 其根据在于若能证实扩增产物的特异性即可确定 RT-PCR 检测结果的可靠性; 同

时对临床样品也作了选择,特选了取自非胃癌患者手术标本(不存在胃癌转移)淋巴结来进行RT-PCR检测,较全面地考察了本法的特异性,显示MUC1作为RT-PCR法检测胃癌淋巴结转移的标志基因具有较高的可靠性及应用价值。此外,本法对于乳腺癌^[4]等上皮源肿瘤淋巴结微转移以及外周血中转移胃癌细胞的检测可能尚有一定的应用价值。

参考文献

- 1 Noguchi S, Aihara T, Nakamori S, et al. The detection of breast carcinoma micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Cancer*, 1994; 74: 1595
- 2 Zotter S, Hageman C, Lossnitzer A, et al. Tissue and tumor distribution of human polymorphic epithelial mucin. *Cancer Rev*, 1988; 11: 55
- 3 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987; 162: 156
- 4 荆永娜, 卢大儒, 邱信芳, 等. 影响反转录过程多种因素的探讨. *细胞生物学杂志*, 1998; 20: 38
- 5 陈瑞川, 杨善民, 张 铮, 等. 视黄酸对 BEL-7402 细胞酶活性及基因表达的影响. *厦门大学学报*, 1998, 37: 259
- 6 Mori M, Mimori K, Inoue H, et al. Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res*, 1995; 55: 3417
- 7 林万明(主编). PCR 技术操作和应用指南. 北京:人民军医出版社, 1993: 39~50

RT-PCR Amplifying MUC1 mRNA Detection Micrometastases of Gastric Cancer

Chen Ruichuan¹, Lin Lan¹, Qiu Datai², et al

(1. Cancer Research Center, Xiamen University, Xiamen, 361005

2. Si-ming Hospital of Xiamen, Xiamen, 361005)

Objective To develop a RT-PCR method to detect gastric cancer micrometastases in gastric axillary lymph nodes from gastric cancer patients. **Methods** The RT-PCR was set up by using specific primer of MUC1(core protein of polymorphic epithelial mucin) cDNA and was first used to estimate the expression status of MUC1 gene in gastric tissue and gastric carcinomas. The specificity and sensitivity were investigated with enzyme digestion and serial dilution method, respectively. Also, this method was performed on clinical axillary lymph nodes and their PCR products were identified by dot hybridization to further estimate the reliability. **Results** (1) MUC1 gene expressed in gastric and gastric cancer cells. (2) The method possessed a high specificity. (3) The detection sensitivity of this system was about one gastric cancer cell in 10⁵ lymph cells. (4) The test results performed on clinical gastric axillary lymph nodes showed that the method was more sensitive than pathological examination and dot hybridization test further showed a high reliability with MUC1 as the PCR target gene. **Conclusion** The RT-PCR method has a high reliability and an application promise in clinical practice.

Key words gastric cancer, metastases; RT-polymerization chain reaction; polymorphic epithelial mucin